

**Cyclic tetrapeptide compound and use thereof****Patent number:** JP2002527449T**Publication date:** 2002-08-27**Inventor:****Applicant:****Classification:**






**- international:** C07K5/12; C12N9/99; A61K38/55; C12P21/02;  
A61P1/16; A61P3/10; A61P29/00; A61P33/00;  
A61P35/00; A61P35/02; A61P37/06; A61P43/00;  
C12N1/14

**- european:** A61K38/12; C07K5/12B

**Application number:** JP20000575884T 19991008

**Priority number(s):** AU1998PP06469 19981013; AU1999PP09257  
19990316; WO1999JP05597 19991008

**Also published as:**

 WO0021979 (A3)  
 WO0021979 (A2)  
 EP1123309 (A3)  
 EP1123309 (A2)  
 US6656905 (B1)

more &gt;&gt;

Report a data error here

Abstract not available for JP2002527449T

Abstract of corresponding document: **US6656905**

A cyclic tetrapeptide compound and use thereof. Especially, a compound WF27082, a process for production of the compound by culturing, in a nutrient medium, a WF27082-producing strain belonging to Acremonium and recovering the compound from a culture broth, a pharmaceutical composition containing the compound as an active ingredient, in association with a pharmaceutically acceptable, substantially non-toxic carrier or excipient, the compound for use as a medicament, a use of the compound for manufacture of a medicament for inhibiting histone deacetylase, a use of the compound for manufacture of a medicament for treating or preventing inflammatory disorders, diabetes, diabetic complications, homozygous thalassemia, fibrosis, cirrhosis, acute promyelocytic leukaemia (APL), protozoal infections, organ transplant rejections, autoimmune diseases, or tumors, a use of histone deacetylase inhibitors as an immunosuppressant or an antitumor agent, and a use of histone deacetylase inhibitors for manufacture of a medicament for treating or preventing organ transplant rejections, autoimmune diseases or tumors are described.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-527449

(P2002-527449A)

(43) 公表日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-ブ-ト* (参考)
C 0 7 K 5/12		C 0 7 K 5/12	4 B 0 6 4
A 6 1 K 38/55		A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/16		3/10	4 C 0 8 4
3/10		29/00	4 H 0 4 5
29/00		33/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-575884(P2000-575884)  
 (86) (22) 出願日 平成11年10月8日 (1999.10.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年4月3日 (2001.4.3)  
 (86) 国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 5 5 9 7  
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 1 9 7 9  
 (87) 国際公開日 平成12年4月20日 (2000.4.20)  
 (31) 優先権主張番号 P P 6 4 6 9  
 (32) 優先日 平成10年10月13日 (1998.10.13)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)  
 (31) 優先権主張番号 P P 9 2 5 7  
 (32) 優先日 平成11年3月16日 (1999.3.16)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(71) 出願人 藤沢薬品工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号  
 (72) 発明者 森 泰亮  
 茨城県土浦市大町5-20-205  
 (72) 発明者 坂本 憲俊  
 茨城県土浦市乙戸南2丁目17-14  
 (72) 発明者 鶴海 泰久  
 茨城県つくば市吾妻3-19-1-3-301  
 (72) 発明者 ▲高▼瀬 茂弘  
 茨城県石岡市総社1-12-10  
 (72) 発明者 日野 資弘  
 茨城県土浦市東崎町13-3-1003  
 (74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環状テトラペプチド化合物およびその用途

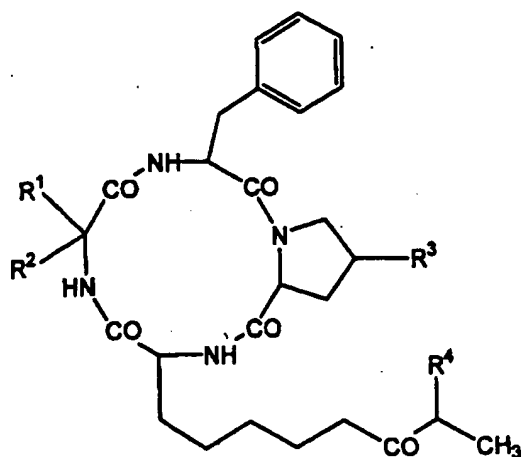
## (57) 【要約】

環状テトラペプチド化合物およびその用途。特に、化合物WF27082、アクレモニウム属に属するWF27082産生株を、栄養培地中で培養し、培養ブロスから該化合物を回収することによる当該化合物の製造方法、この化合物を、医薬上許容され得る実質的に非毒性の担体または賦形剤とともに活性成分として含む医薬組成物、医薬としての使用のためのこの化合物、ヒストンデアセチラーゼを阻害するための医薬の製造のためのこの化合物の使用、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、原生動物感染または臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患、または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のためのこの化合物の使用、免疫抑制剤または抗腫瘍剤としてのヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用、および臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患、または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のための、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用が記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の式のWF27082化合物：

【化1】



ここで、R<sup>1</sup>はメチルであり、R<sup>2</sup>はメチルまたはエチルであり、R<sup>3</sup>は水素またはメチルであり、そしてR<sup>4</sup>は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシであり、

ただし、R<sup>3</sup>が水素である場合、R<sup>2</sup>はエチルである。

【請求項2】 R<sup>1</sup>がメチルであり、R<sup>2</sup>がエチルであり、R<sup>3</sup>がメチルであり、そしてR<sup>4</sup>がヒドロキシである、請求項1に記載のWF27082化合物。

【請求項3】 受託番号FERM BP-6539を有し、そしてヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生する、アクレモニウム属に属する真菌株。

【請求項4】 ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物であって、請求項3に記載の真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をそれらの培養ブロスから回収することにより得られる化合物。

【請求項5】 請求項1に記載のWF27082化合物を製造する方法であって、アクレモニウム属に属するWF27082産生株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をそれらの培養ブロスから回収することを包含する方法。

【請求項6】 アクレモニウム属に属するWF27082産生株が請求項3

に記載の真菌株である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項1に記載のWF27082化合物を、医薬上許容され得る実質的に非毒性の担体または賦形剤と共に活性成分として含む、医薬組成物。

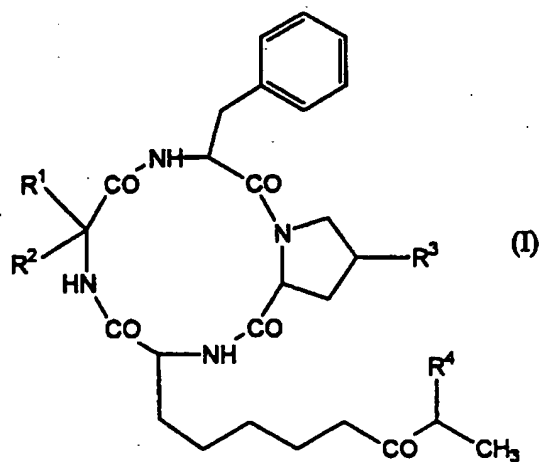
【請求項8】 医薬としての使用のための、請求項1に記載の化合物。

【請求項9】 ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を製造する方法であって、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生するアクレモニウム属に属する真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物を回収することを包含する方法。

【請求項10】 ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物であって、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生するアクレモニウム属に属する真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をそれらの培養ブロスから回収することにより得られる化合物。

【請求項11】 以下の式(I)の化合物を含む、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤：

【化2】



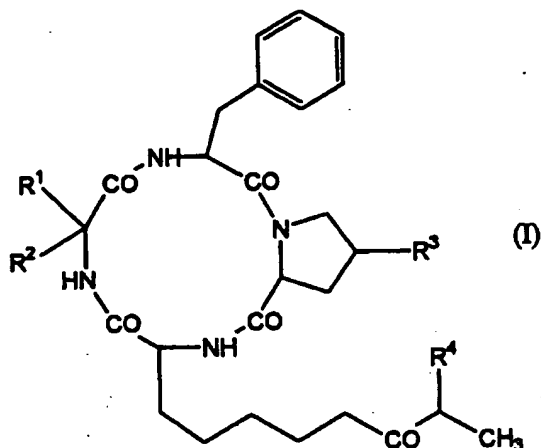
ここで、 $R^1$ はメチルであり、 $R^2$ はメチルまたはエチルであり、 $R^3$ は水素またはメチルであり、そして $R^4$ は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシである。

【請求項 1 2】 ヒストンデアセチラーゼを阻害するための方法であって、請求項 1 1 で使用される式 (I) の化合物を使用することを包含する方法。

【請求項 1 3】 ヒストンデアセチラーゼを阻害するための医薬の製造のための、請求項 1 1 で使用される式 (I) の化合物の使用。

【請求項 1 4】 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植後の拒絶、または自己免疫疾患を処置または予防するための医薬組成物であって、以下の式 (I) の化合物を活性成分として含む、組成物：

【化 3】



ここで、 $R^1$ はメチルであり、 $R^2$ はメチルまたはエチルであり、 $R^3$ は水素またはメチルであり、そして $R^4$ は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシである。

【請求項 1 5】 請求項 1 4 で使用される化合物 (I) をヒトまたは動物に投与することを包含する、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、または臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患を処置または予防するための方法。

【請求項 1 6】 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植後の拒絶、または自己免疫疾患を処置または予防するための医薬の製造のための、請求項 1 4

で用いられる式 (I) の化合物の使用。

【請求項 17】 請求項 1 で使用される化合物 WF 27082 を、ヒトまたは動物に投与することを包含する、原生動物感染または腫瘍を処置または予防するための方法。

【請求項 18】 原生動物感染または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のための、請求項 1 で使用される化合物 WF 27082 の使用。

【請求項 19】 免疫抑制剤または抗腫瘍剤としての、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用。

【請求項 20】 臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患、または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のための、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、医薬として有用な環状テトラペプチド化合物、同化合物の製造方法および同化合物を含む医薬組成物に関する。

【0002】

(背景技術)

ヒストンデアセチラーゼは遺伝子発現を調節するための転写機構において必須の役割を担うことおよびヒストンデアセチラーゼ阻害剤はヒストン過アセチル化を誘発し遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている。従って、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤は、異常な遺伝子発現により引き起こされるいくつかの疾患（例えば、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病（APL）、原生動物感染など）のための治療薬または予防薬として有用である。

【0003】

これに関して、抗腫瘍剤として使用され得る環状テトラペプチド化合物がJP-A-7-196686に開示されているが、この公報は、ヒストンデアセチラーゼに対する作用および上記の種々の疾患に対する効果について言及していない。

【0004】

(発明の開示)

本発明は、医薬として有用な新規な環状テトラペプチド化合物WF27082、同化合物の製造方法および同化合物を含む医薬組成物に関する。

【0005】

より詳細には、本発明は、ヒストンデアセチラーゼ活性への強力な阻害効果を有する環状テトラペプチド化合物に関する。

【0006】

本発明の発明者らはまた、WF27082などのヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、強力な免疫抑制効果および強力な抗腫瘍効果を有することを見出した。従

って、WF27082などのヒストンデアセチラーゼ阻害剤は、免疫抑制剤および抗腫瘍剤の活性成分として有用であり、そして臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患、腫瘍などのための治療薬または予防薬として有用である。

【0007】

従って、本発明の目的の1つは、上記のような生物学的活性を有する化合物を提供することである。

【0008】

本発明の別の目的は、アクレモニウム (Acremonium) 属に属するWF27082産生株の栄養培地中での醗酵によるWF27082の製造方法を提供することである。

【0009】

本発明のさらなる別の目的は、活性成分としてWF27082を含む医薬組成物を提供することである。

【0010】

本発明のさらにさらなる別の目的は、上記疾患を処置および予防するための、WF27082のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤の用途を提供することである。

【0011】

従って、本発明は、以下を提供する。

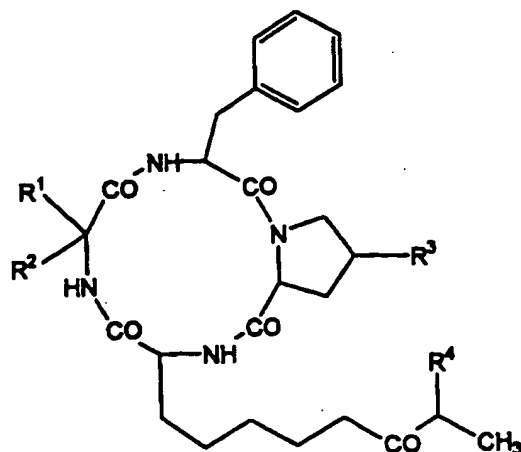
【0012】

(1) 式

【0013】

【化4】





【0014】

(式中、 $R^1$ はメチルであり、 $R^2$ はメチルまたはエチルであり、 $R^3$ は水素またはメチルであり、そして $R^4$ は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシであり、ただし、 $R^3$ が水素である場合、 $R^2$ はエチルである)であるWF 27082化合物。

(2)  $R^1$ がメチルであり、 $R^2$ がエチルであり、 $R^3$ がメチルであり、そして $R^4$ がヒドロキシである、上記(1)に記載のWF 27082化合物。

(3) 受託番号FERM BP-6539であり、そしてヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生する、アクレモニウム属に属する真菌株。

(4) ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物であって、上記(3)に記載の真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をそれらの培養プロセスから回収することにより得られる化合物。

(5) 上記(1)に記載のWF 27082化合物を製造する方法であって、アクレモニウム属に属するWF 27082産生株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をその培養プロセスから回収することを包含する方法。

(6) アクレモニウム属に属するWF 27082産生株が上記(3)に記載の真菌株である、上記(5)に記載の方法。

(7) 上記(1)に記載のWF 27082化合物を、医薬上許容され得る実質的に非毒性の担体または賦形剤と共に活性成分として含む、医薬組成物。

(8) 医薬としての使用のための、上記(1)に記載の化合物。

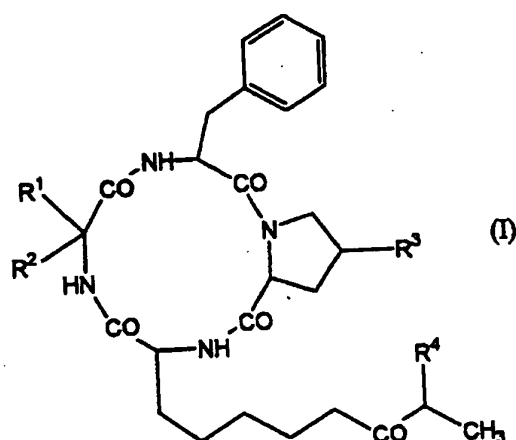
(9) ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を製造する方法であつて、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生するアクレモニウム属に属する真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物を回収することを包含する方法。

(10) ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物であつて、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を産生するアクレモニウム属に属する真菌株を栄養培地中で培養すること、および該化合物をその培養プロセスから回収することにより得られる化合物。

(11) 式(1)の化合物を含む、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤：

【0015】

【化5】



【0016】

ここで、R<sup>1</sup>はメチルであり、R<sup>2</sup>はメチルまたはエチルであり、R<sup>3</sup>は水素またはメチルであり、そしてR<sup>4</sup>は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシである。

(12) 上記(11)で使用される式(1)の化合物を使用することを包含する、ヒストンデアセチラーゼを阻害するための方法。

(13) ヒストンデアセチラーゼを阻害するための医薬の製造のための、上記(

11) で使用される式 (I) の化合物の使用。

(14) 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植後の拒絶、または自己免疫疾患を処置または予防するための医薬組成物であって、活性成分として、 $R^1$  がメチルであり、 $R^2$  がメチルまたはエチルであり、 $R^3$  が水素またはメチルであり、そして  $R^4$  が任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシである式 (I) の化合物を含む、医薬組成物。

(15) 上記 (14) で使用される化合物 (I) をヒトまたは動物に投与することを包含する、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL) または臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患を処置または予防するための方法。

(16) 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合型サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植後の拒絶、または自己免疫疾患を処置または予防するための医薬の製造のための、上記 (14) で用いられる式 (I) の化合物の使用。

(17) 上記 (1) で使用される化合物 WF 27082 を、ヒトまたは動物に投与することを包含する、原生動物感染または腫瘍を処置または予防するための方法。

(18) 原生動物感染または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のための、上記 (1) で使用される化合物 WF 27082 の使用。

(19) 免疫抑制剤または抗腫瘍剤としての、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用。

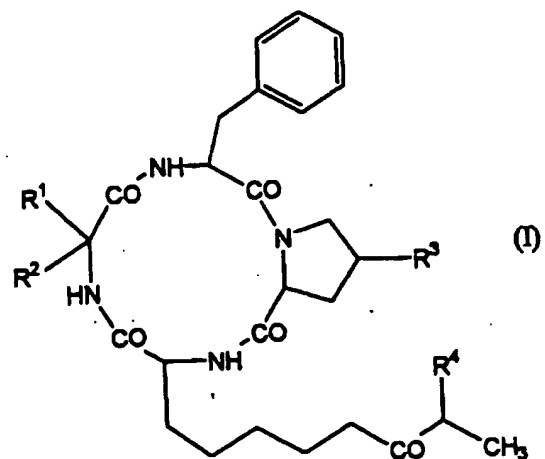
(20) 臓器移植後の拒絶、自己免疫疾患、または腫瘍を処置または予防するための医薬の製造のための、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用。

#### 【0017】

ヒストンデアセチラーゼの活性に強力な阻害効果を有する化合物は、以下の式 (I) で表すことができる。

#### 【0018】

【化6】



【0019】

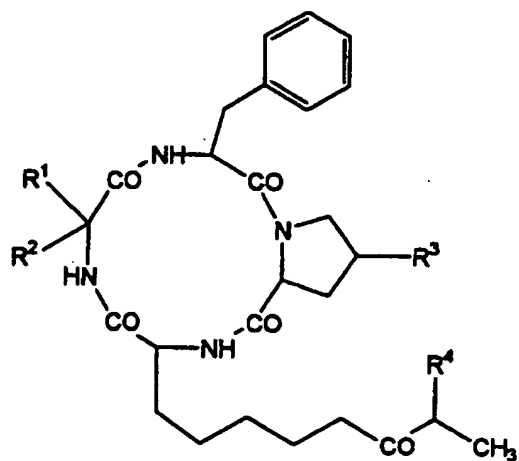
(式中、R<sup>1</sup>はメチルであり、R<sup>2</sup>はメチルまたはエチルであり、R<sup>3</sup>は水素またはメチルであり、そしてR<sup>4</sup>は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシである。)

【0020】

これらの一連の化合物のうち、特に以下の式の化合物は新規化合物である。

【0021】

【化7】



【0022】

(式中、 $R^1$ はメチルであり、 $R^2$ はメチルまたはエチルであり、 $R^3$ は水素またはメチルであり、そして $R^4$ は任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシであり、ただし、 $R^3$ が水素である場合、 $R^2$ はエチルである。)

【0023】

$R^1$ がメチルであり、 $R^2$ がメチルまたはエチルであり、 $R^3$ が水素またはメチルであり、そして $R^4$ が任意にヒドロキシ保護基を有するヒドロキシであり、ただし、 $R^3$ が水素である場合、 $R^2$ がエチルである、式(I)を有する本発明の化合物はまた、WF27082ともいう。

【0024】

上記定義およびそれらの好ましい実施態様の詳細を、以下に詳細に説明する。

【0025】

本明細書中で用いられる用語「低級」は、他に示されない限り、1～6の炭素原子を意味することを意図する。

【0026】

適切なヒドロキシ保護基には、以下が挙げられ得る：

例えば、低級アルキルチオメチル（例えば、メチルチオメチル、エチルチオメチル、プロピルチオメチル、イソプロピルチオメチル、ブチルチオメチル、イソブチルチオメチル、ヘキシルチオメチルなど）などのような1-（低級アルキルチオ）（低級）アルキル、ここで、好ましいものは、 $C_1 \sim C_4$ アルキルチオメチルであり得、そして最も好ましいものは、メチルチオメチルであり得る；

例えば、トリ（低級）アルキルシリル（例えば、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリブチルシリル、tert-ブチル-ジメチルシリル、トリ-tert-ブチルシリルなど）、低級アルキルジアリールシリル（例えば、メチル-ジフェニルシリル、エチル-ジフェニルシリル、プロピル-ジフェニルシリル、tert-ブチル-ジフェニルシリルなど）のような三置換シリル、ここで、好ましいものは、トリ（ $C_1 \sim C_4$ ）アルキルシリルおよび $C_1 \sim C_4$ アルキル-ジフェニルシリルであり得、そして最も好ましいものは、tert-ブチル-ジメチルシリルおよびtert-ブチル-ジフェニルシリルであり得る；

例えば、脂肪族アシル、芳香族アシル、ならびにカルボン酸およびスルホン酸か

ら誘導された、芳香族基で置換された脂肪族アシルなどのようなアシル。

【0027】

脂肪族アシルには、1つまたはそれ以上のカルボキシのような適切な置換基を有してもよい低級アルカノイル（例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチル、イソブチル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、カルボキシアセチル、カルボキシプロピオニル、カルボキシブチル、カルボキシヘキサノイルなど）、1つまたはそれ以上の低級アルキルのような適切な置換基を有してもよいシクロ（低級）アルキルオキシ（低級）アルカノイル（例えば、シクロプロピルオキシアセチル、シクロブチルオキシプロピオニル、シクロヘプチルオキシブチル、メンチルオキシアセチル、メンチルオキシプロピオニル、メンチルオキシブチル、メンチルオキシヘプタノイル、メンチルオキシヘキサノイルなど）、カンファースルホニルなどが挙げられ得る。

【0028】

芳香族アシルには、1つまたはそれ以上のニトロのような適切な置換基を有してもよいアロイル（例えば、ベンゾイル、トルオイル、キシロイル、ナフトイル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、ニトロナフトイルなど）、1つまたはそれ以上のハロゲンのような適切な置換基を有してもよいアレーンスルホニル（例えば、ベンゼンスルホニル、トルエンスルホニル、キシレンスルホニル、ナフタレンスルホニル、フルオロベンゼンスルホニル、クロロベンゼンスルホニル、ブロモベンゼンスルホニル、ヨードベンゼンスルホニルなど）などが挙げられ得る。

【0029】

芳香族基で置換された脂肪族アシルには、1つまたはそれ以上の低級アルコキシおよびトリハロ（低級）アルキルのような適切な置換基を有してもよいアル（低級）アルカノイルなど（例えば、フェニルアセチル、フェニルプロピオニル、フェニルブチル、2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニルアセチル、2-エチル-2-トリフルオロメチル-2-フェニルアセチル、2-トリフルオロメチル-2-プロポキシ-2-フェニルアセチルなど）などが挙げられ得る。

【0030】

上記式(1)の化合物が立体異性体を有する場合、このような異性体もまた本発明に包含される。式(1)の化合物は塩を形成し得、これもまた本発明に包含される。例えば、アミノ基のような塩基性基が分子中に存在する場合、酸付加塩(例えば、無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、有機酸(例えば、メタンスルホン酸、フマル酸、マレイン酸、マンデル酸、クエン酸、サリチル酸など)との塩)が例示され、そして例えば、カルボキシル基のような酸性基が存在する場合、塩基性塩(例えば、金属(例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウムなど)との塩、アミノ酸(例えば、リジンなど)との塩など)が例示される。加えて、それらの溶媒和物(例えば、水和物、エタノール和物など)もまた本発明に包含される。

【0031】

この明細書において、特定の化合物の以下の命名が簡便に用いられる。

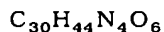
【0032】

化合物名		$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$
WF27082 B		$-CH_3$	$-CH_2CH_3$	$-CH_3$	$-OH$
WF27082 E		$-CH_3$	$-CH_2CH_3$	$-H$	$-OH$
WF27082 F		$-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_3$	$-OH$
FR235220		$-CH_3$	$-CH_3$	$-H$	$-OH$

【0033】

WF27082Bは、以下の物理化学的特性を有する：

分子式：



分子量：

ESI-MS (+):  $m/z$  557 (M + H)<sup>+</sup>

ESI-MS (-):  $m/z$  555 (M - H)<sup>-</sup>

比旋光度：

$[\alpha]_D(23^\circ C)$   $-129^\circ$  (c=0.5、クロロホルム中)

紫外吸収スペクトル：

$\lambda_{\max}$  (メタノール): 235 (sh)  
 $\lambda_{\max}$  (メタノール+0.01N HCl): 235 (sh)  
 $\lambda_{\max}$  (メタノール+0.01N NaOH): 235 (sh)

溶解性:

可溶: メタノール、クロロホルム、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド  
不溶: ヘキサン

呈色反応:

陽性: 硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応、ドラーゲンドルフ反応  
陰性: ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応、エールリッヒ

反応

薄層クロマトグラフィー (TLC):

固定相	展開溶媒	Rf値
Silica Gel 60 F254*	クロロホルム: メタノール (20:1, v/v)	0.58

\*E. Merck社製

高速液体クロマトグラフィー (HPLC):

条件:

移動相: アセトニトリル: 水=50:50  
カラム: YMC ODS AM-303\*\* (長さ250 mm×内径4.6 mm)  
流速: 1.0 ml/分  
検出: UV (210 nmで)  
保持時間: 10.2分  
\*\*YMC Co., Ltd. 社製

赤外スペクトル:

$\nu_{\max}$  (ニート): 3300, 2960, 2940, 2880, 1715, 1680, 1660, 1630, 1510,  
1440, 1380, 1250, 1060  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル:

(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  H  
7.52 (1H, d, J=10Hz, 交換可能), 7.30 - 7.17 (5H, m), 7.17 (1H, d, J=10Hz)



, 交換可能), 5.81 (1H, s, 交換可能), 5.16 (1H, m), 4.67 (1H, m), 4.26 - 4.16 (2H, m), 4.05 (1H, dd, J=10 & 7.5 Hz), 3.56 (1H, d, J=5Hz, 交換可能), 3.24 (1H, dd, J=13.5 & 10Hz), 2.96 (1H, dd, J=13.5 & 6Hz), 2.73 (1H, dd, J=10 & 8Hz), 2.62 (1H, m), 2.54 - 2.29 (4H, m), 2.16 (1H, m), 1.82 (1H, m), 1.66 - 1.56 (3H, m), 1.38 (3H, d, J=7Hz), 1.41 - 1.27 (5H, m), 1.28 (3H, s), 0.88 (3H, d, J=6.5Hz), 0.84 (3H, t, J=7Hz)。

<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル:

(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)      δ C

212.4 (s), 175.6 (s), 174.1 (s), 173.1 (s), 171.9 (s), 137.0 (s), 129.0 (d) x 2, 128.6 (d) x 2, 126.7 (d), 72.6 (d), 63.0 (s), 58.0 (d), 54.4 (d), 53.8 (t), 53.3 (d), 37.2 (t), 35.7 (t), 33.0 (t), 32.8 (d), 28.8 (t), 28.8 (t), 27.8 (t), 25.3 (t), 23.2 (t), 22.4 (q), 19.8 (q), 18.1 (q), 8.4 (q)。

物質の特性:

中性物質

【0034】

WF27082Eは、以下の物理化学的性質を有する:

分子式:

C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

分子量:

ESI-MS (+): m/z 543 (M + H)<sup>+</sup>

比旋光度:

[α]<sub>D</sub>(23℃) -137° (c=0.2、クロロホルム中)

紫外吸収スペクトル:

λ<sub>max</sub> (メタノール): 235(sh)

λ<sub>max</sub> (メタノール+0.01N HCl): 235(sh)

λ<sub>max</sub> (メタノール+0.01N NaOH): 235(sh)

溶解性:

可溶: メタノール、クロロホルム、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド

#### 呈色反応

陽性：硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応、ドラーゲンドルフ反応

陰性：ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応、エールリッヒ

#### 反応

薄層液体クロマトグラフィー (TLC) :

固定相	展開溶媒	Rf値
Silica Gel 60 F254*	クロロホルム：メタノール (20:1, v/v)	0.46

\*E. Merck社製

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) :

#### 条件:

移動相：アセトニトリル：水=50：50

カラム：YMC ODS AM-303\*\* (長さ250 mm×内径4.6 mm)

流速：1.0 ml/分

検出：UV (210 nmにて)

保持時間：7.6分

\*\*YMC Co., Ltd. 社製

#### 赤外スペクトル:

$\nu_{\max}$  (ニート) : 3300, 2940, 1720, 1690, 1660, 1630, 1530, 1460, 1420,  
1380, 1320, 1250, 1150, 1060  $\text{cm}^{-1}$

#### $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル:

(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  H

7.54 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ , 交換可能), 7.29 - 7.17 (5H, m), 7.10 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ ,  
交換可能), 5.82 (1H, s, 交換可能), 5.19 (1H, m), 4.67 (1H, m), 4.26 - 4  
.17 (2H, m), 3.85 (1H, m), 3.54 (1H, br. s, 交換可能), 3.30 - 3.20 (2H, m  
) , 2.96 (1H, dd,  $J=14$  & 6Hz), 2.54 - 2.38 (2H, m), 2.36 - 2.28 (2H, m),  
2.18 - 2.12 (2H, m), 1.84 - 1.72 (3H, m), 1.67 - 1.57 (3H, m), 1.38 (3H,  
d,  $J=7\text{Hz}$ ), 1.37 - 1.23 (4H, m), 1.28 (3H, s), 0.83 (3H, t,  $J=7\text{Hz}$ )

#### $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル:

(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)      δ C  
 212.4 (s), 175.6 (s), 174.1 (s), 172.8 (s), 171.8 (s), 137.0 (s), 129.0  
 (d) x 2, 128.6 (d) x 2, 126.7 (d), 72.6 (d), 63.1 (s), 57.8 (d), 54.4 (d  
 ), 53.3 (d), 47.0(t), 37.3 (t), 35.8 (t), 28.8 (t), 28.7 (t), 27.9 (t),  
 25.3 (t), 25.0 (t), 24.7 (t), 23.2 (t), 22.4 (q), 19.8 (q), 8.4 (q)。

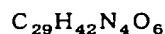
物質の特性：

中性物質

【0035】

WF27082Fは、以下の物理化学的特性を有する：

分子式：



分子量：

ESI-MS (+): m/z 543 (M + H)<sup>+</sup>

比旋光度：

[α]<sub>D</sub> (23℃) -114° (c=0.3, クロロホルム中)

紫外吸収スペクトル：

λ<sub>max</sub> (メタノール)： 235(sh)

λ<sub>max</sub> (メタノール+0.01N HCl)： 235(sh)

λ<sub>max</sub> (メタノール+0.01N NaOH)： 235(sh)

溶解性：

可溶：メタノール、クロロホルム、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド

呈色反応

陽性：硫酸セリウム反応、ヨウ素蒸気との反応、ドラーゲンドルフ反応

陰性：ニンヒドリン反応、塩化第二鉄反応、モーリッシュ反応、エールリッヒ

反応

薄層クロマトグラフィー (TLC)：

固定相	展開溶媒	Rf値
Silica Gel 60	クロロホルム：メタノール	0.47
F254*	(20:1, v/v)	

\*E. Merck社製

高速液体クロマトグラフィー (HPLC):

条件:

移動相: アセトニトリル: 水=50:50

カラム: YMC ODS AM-303\*\* (長さ250 mm × 内径4.6 mm)

流速: 1.0 ml/分

検出: UV (210 nmにて)

保持時間: 7.6分

\*\*YMC Co., Ltd. 社製

赤外スペクトル:

$\nu_{\max}$  (ニート): 3300, 2930, 1720, 1690, 1660, 1630, 1530, 1440, 1390,  
1280, 1180, 1120, 1060  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル:

(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta \text{H}$

7.47 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ , 交換可能), 7.30 - 7.18 (5H, m), 7.17 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ ,  
交換可能), 5.88 (1H, s, 交換可能), 5.14 (1H, m), 4.66 (1H, m), 4.26 - 4.  
14 (2H, m), 4.05 (1H, dd,  $J=10$  & 8Hz), 3.54 (1H, d,  $J=5\text{Hz}$ , 交換可能), 3.2  
7 (1H, dd,  $J=14$  & 10 Hz), 2.94 (1H, dd,  $J=14$  & 6Hz), 2.70 (1H, dd,  $J=10$  &  
8 Hz), 2.61 (1H, m), 2.53 - 2.35 (3H, m), 1.80 (1H, m), 1.78 (3H, s), 1.  
70 - 1.57 (3H, m), 1.40 - 1.25 (5H, m), 1.38 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ ), 1.34 (3H, s),  
0.86 (3H, d,  $J=7\text{Hz}$ )

$^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル:

(125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta \text{C}$

212.4 (s), 175.6 (s), 174.3 (s), 173.0 (s), 171.9 (s), 137.0 (s), 129.0  
(d) x 2, 128.6 (d) x 2, 126.7 (d), 72.6 (d), 58.8 (s), 57.9 (d), 54.3 (d  
) , 53.9 (t), 53.5 (d), 37.3 (t), 35.7 (t), 33.0 (t), 32.8 (d), 28.8 (t), 2  
8.7 (t), 26.5 (q), 25.2 (t), 23.5 (q), 23.2 (t), 19.8 (q), 18.1 (q)。

物質の特性:

中性物質

#### 【0036】

上記の物理化学的特性およびさらなる研究から、WF27082B、EおよびFの化学的構造がそれぞれ上記のように帰属された。

#### 【0037】

WF27082は、アクレモニウムに属するWF27082産生株（例えば、アクレモニウム エスピー、No. 27082）を栄養ブロス中で培養すること、および任意に化学修飾を付与すること（例えば、ヒドロキシ保護基の導入など）により製造することができる。

#### 【0038】

例えば、R<sup>4</sup>がヒドロキシ保護基を有するヒドロキシであるWF27082は、R<sup>4</sup>がヒドロキシである化合物にヒドロキシ保護基を導入することにより調製され得る。

#### 【0039】

本反応で用いられるヒドロキシ保護基の適切な導入剤は、一般的に用いられるもの、例えば、ジ（低級）アルキルスルホキシド（例えば、低級アルキルメチルスルホキシド（例えば、ジメチルスルホキシド、エチルメチルスルホキシド、プロピルメチルスルホキシド、イソプロピルメチルスルホキシド、ブチルメチルスルホキシド、イソブチルメチルスルホキシド、ヘキシルメチルスルホキシドなど））、トリ置換シリル化合物（例えば、トリ（低級）アルキルシリルハライド（例えば、トリメチルシリルクロリド、トリエチルシリルプロミド、トリブチルシリルクロリド、tert-ブチル-ジメチルシリルクロリドなど））、低級アルキル-ジアリールシリルハライド（例えば、メチル-ジフェニルシリルクロリド、エチル-ジフェニルシリルプロミド、プロピル-ジトリルシリルクロリド、tert-ブチル-ジフェニルシリルクロリドなど）および上記したようなアシル基を導入し得るアシル化剤（例えば、カルボン酸、スルホン酸およびその反応性誘導体（例えば、酸ハライド、酸無水物、活性アミド、活性エステルなど））であり得る。このような反応性誘導体の好ましい例には、酸クロリド、酸プロミド、以下の酸（例えば、置換リン酸（例えば、ジアルキルリン酸、フェニルリン酸、ジフェニルリン酸、ジベンジルリン酸、ハロゲン化リン酸など）、ジアルキル亜リン酸

、亜硫酸、チオ硫酸、硫酸、アルキルカーボネート（例えば、メチルカーボネート、エチルカーボネート、プロピルカーボネートなど）、脂肪族カルボン酸（例えば、ピバル酸、ペンタン酸、イソペンタン酸、2-エチル酪酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸など）、芳香族カルボン酸（例えば、安息香酸など）などの酸）との混合酸無水物、対称酸無水物、イミノ官能基を含むヘテロ環化合物（例えば、イミダゾール、4-置換イミダゾール、ジメチルピラゾール、トリアゾールおよびテトラゾール）を有する活性酸アミド、活性エステル（例えば、p-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、メシルフェニルエステル、フェニルアゾフェニルエステル、フェニルチオエステル、p-ニトロフェニルチオエステル、p-クレジルチオエステル、カルボキシメチルチオエステル、ビリジルエステル、ピペリジニルエステル、8-キノリルチオエステル）、あるいはN-ヒドロキシ化合物を有するエステル（例えば、N, N-ジメチルヒドロキシルアミン、1-ヒドロキシ-2-(1H)-ピリドン、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-6-クロロベンゾトリアゾールなど）などが挙げられ得る。

#### 【0040】

この反応において、ジ（低級）アルキルスルホキシドがヒドロキシ保護基の導入剤として用いられる場合、この反応は、通常、無水酢酸のような低級アルカン酸無水物の存在下で行われる。

#### 【0041】

さらに、トリ置換シリル化合物がヒドロキシ保護基の導入剤として用いられる場合、この反応は、好ましくは通常の縮合剤（例えば、イミダゾールなど）の存在下で実行される。

#### 【0042】

なおさらに、アシル化剤がヒドロキシ保護基の導入剤として用いられる場合、この反応は、好ましくは、以下のものの存在下で実行される：有機または無機塩基（例えば、アルカリ金属（例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなど）、アルカリ土類金属（例えば、カルシウムなど）、アルカリ金属水素化物（例えば

、水素化ナトリウムなど)、アルカリ土類金属水素化物(例えば、水素化カルシウムなど)、アルカリ金属水酸化物(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなど)、アルカリ金属炭酸塩(例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなど)、アルカリ金属炭酸水素塩(例えば、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムなど)、アルカリ金属アルコキシド(例えば、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウムtert-ブトキシドなど)、アルカリ金属アルカン酸(例えば、酢酸ナトリウムなど)、トリアルキルアミン(例えば、トリエチルアミンなど)、ピリジン化合物(例えば、ピリジン、ルチジン、ピコリン、4-N, N-ジメチルアミノピリジンなど)、キノリンなど)。

#### 【0043】

この反応において、アシル化剤が遊離形態またはその塩で用いられる場合、この反応は、好ましくは以下の通常の縮合剤の存在下で実行される:例えば、カルボジイミド化合物[例えば、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-シクロヘキシル-N'-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、N, N'-ジエチルカルボジイミド、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなど]、ケテンイミン化合物(例えば、N, N'-カルボニルビス(2-メチルイミダゾール)、ペンタメチレンケテン-N-シクロヘキシルイミン、ジフェニルケテン-N-シクロヘキシルイミンなど);オレフィン性またはアセチレン性エーテル化合物(例えば、エトキシアセチレン、 $\beta$ -シクロビニルエチルエーテル)、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール誘導体のスルホン酸エステル[例えば、1-(4-クロロベンゼンスルホンイルオキシ)-6-クロロ-1H-ベンゾトリアゾールなど]など。

#### 【0044】

この反応は、通常、反応に悪影響しない通常の溶媒(例えば、水、アセトン、ジクロロメタン、アルコール(例えば、メタノール、エタノールなど)、テトラヒドロフラン、ピリジン、N, N-ジメチルホルムアミドなど、またはそれらの混合物)中で実行され、さらに、塩基またはヒドロキシ保護基の導入剤が液体である場合、これらもまた溶媒として使用され得る。

【0045】

反応温度は重要ではなく、この反応は、通常、冷却下～加熱下で実行される。

【0046】

(産生株No. 27082の特性)

真菌株No. 27082は、日本国秋田県秋田市にて採集された土壌試料から初めて単離された。この菌は、種々の培養培地上で非常に抑制的に成長し、そしてオレンジ白色～暗褐色のコロニーを形成した。この株は、単純フィアロ型分生子形成細胞および粘性性頭中の分生子からなる分生子構造を産生したが、一方、この株は、培養培地上でテレオモルフを形成しなかった。この株の菌類学的特性は以下の通りであった。

【0047】

種々の寒天培地上での培養特性を表1に要約する。ポテトデキストロース寒天上での培養物は非常に抑制的に成長し、25℃にて4週間後、直径1.5～2.5cmに達した。このコロニー表面は、中央が盛り上がり、綿状であり、放射状に溝を有して、皺がより、滲出液を生じ、縁がオレンジ白色である以外は褐色がかかったオレンジ～灰色味褐色であった。分生子構造は培地上で観察されなかった。裏面の色は暗褐色であり、褐色の可溶性色素が産生された。コーンミール寒天上のコロニーは、同条件下で、ポテトデキストロース寒天上での速度と同様の速度で広がった。表面は、平坦で、薄く、粉状であり、中央はオリーブ色でありかつ縁はオレンジ白色であった。分生子構造は豊富に形成された。裏面は中央が暗褐色であり、縁は灰色味オレンジ色～灰色味褐色であり、淡いオレンジ色の可溶性色素が観察された。

【0048】

形態学的特性は、MiuraのLCAプレート(Miura, K. および M. Kudo: Trans. Mycol. Soc. Japan, 11:116-118, 1970)上での培養に基づき決定した。分生子柄はまれに存在し、未分化型であり、短く、基部周辺で分枝し、しばしば輪生であった。分生子細胞は、分離し、頂生性であり、フィアロ型であり、かつ単独または縄状の気中菌糸から生じた。それらは無色であり、微細に粗面であり、針状から錐状で、不明瞭なカラーを有し、21～40μmの長さであり、(1.5～)



2～2.5  $\mu\text{m}$ の基部付近から1～2 (～2.5  $\mu\text{m}$ )の先端へと先が細くなり、粘液性の集塊の分生子を形成する。分生子は最初は無色であり、成熟にて暗オリーブ色になり、平滑な、1つの細胞であり、広い楕円～楕円であり、しばしば洋ナシ型であり、先端が丸みをおび基部に小さい突起を有し、サイズは3.5～5 (～6)  $\times$  2.5～3 (～3.5)  $\mu\text{m}$ であった。栄養性菌糸は、無色であり、平滑であり、隔壁を有し、かつ枝分かれしていた。菌糸細胞は円筒状であり、幅が2～3  $\mu\text{m}$ であった。厚膜胞子は観察されなかった。

【0049】

No. 27082株は、2～26℃の温度範囲内で生育可能であり、最適生育条件は21～22℃であった。これらの温度データは、ポテトデキストロース寒天（日水社製）上で決定された。

【0050】

von Arxによる真菌の分類基準(J. A. von Arx: The Genera of Fungi - Sporulating in Pure Culture. 第3版, 第315頁, J. Cramer, Vaduz, 1974) およびDomschら(K. H. Domsch, W. GamsおよびT. -H. Anderson: Compendium of Soil Fungi. 第1巻, 第859頁, Academic Press, London, 1980)と比較した形態学的特徴に基づいて、No. 27082株は不完全糸状菌綱アクレモニウム属(Link (1809))に属すると考えられた。従って、本発明者らは、この分離株をアクレモニウム属の1つの株として同定し、これをアクレモニウム エスピーNo. 27082と命名した。当該株は、通商産業省工業技術院生命工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 305-8566、にFERM BP-6539として寄託されている（寄託日：1998年10月2日）。

【0051】

【表1】

表1. No. 27082株の培養特性

培地	培養特性
麦芽抽出物寒天*	<p>G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm</p> <p>S : 円形、平坦、フェルト状～綿状、  いくらかの分生子構造を形成した、  中央部でオリーブ褐色(4D3-4E3)、  緑部でオレンジ白色(6A2)  または灰色味オレンジ色(6B4-6B5)</p> <p>R : 中央部で褐色(7E8)、  緑部で淡いオレンジ色(5A3)</p>
ポテトデキストロース 寒天(Difco 0013)	<p>G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm</p> <p>S : 円形、中央が隆起している、綿状、  放射状に溝がある～皺がよっている、  滲出液を生じ、分生子構造を形成しな  かった、  緑部で褐色味オレンジ色(7C4)～  灰色味褐色(7D3)、  およびオレンジ白色(6A2)</p> <p>R : 暗褐色(7F7-7F8)であり、褐色の可溶性  色素を産生する</p>
ツアベックの溶液 寒天*	<p>G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm</p> <p>S : 円形～不規則、平坦～中央が隆起している、  緑部で埋没している (submerged)、  分生子構造を形成しなかった、  中央部で暗褐色(7F6)または  オレンジ白色(6A2)、  緑部で黄色味白色(4A2)、および  中間部で褐色(6E6-6E8)</p> <p>R : 暗褐色(6F5-6F7)、および  緑部で黄色味白色(4A2)</p>

サブローデキストロース  
寒天(Difco 0190)

G : 非常に抑制的、1.5-2.0cm  
S : 円形、中央が隆起している、  
フェルト状、放射状に溝がある～  
皺がよっている、分生子構造を形成しな  
かった、中央部で灰色味オレンジ色  
(6B4-6B5)、および縁部で明るい褐色(6D6)  
～褐色(6B6)  
R : 褐色(7E7)～暗褐色(7F7)であり、かつ  
褐色の可溶性色素を産生する

エマーソン Yp Ss 寒天  
(Difco 0739)

G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm  
S : 円形、平坦、フェルト状、滲出液を生じ、  
分生子構造を形成しなかった、  
縁部においてオレンジ白色(5A2)、  
および明るい褐色(6D6-6D7)  
R : 明るい褐色(6D7)～暗褐色(6F7)

コーンミール  
寒天(Difco 0386)

G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm  
S : 円形、平坦、薄い、粉状、分生子構造を  
豊富に産生した、中央部でオリーブ色  
(3F5-3F6)、そして  
縁部でオレンジ白色(6A2)  
R : 中央部で暗褐色(7F7)、縁部で灰色  
がかったオレンジ色(5B4)～灰色がかった  
褐色(5D3)、および淡いオレンジ色の  
可溶性色素を産生する

MY20 寒天\*

G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm  
S : 円形、中央が隆起している、綿状～毛屑状、  
放射状に皺がよっている、分生子構造を  
形成しなかった、そして中央部で灰色  
がかったオレンジ色(6B4-6B6)であり、  
そして縁部でオレンジ白色(5A2)である  
R : 縁部が明るい褐色(6D7-6D8)および  
明るいオレンジ色 (5A5)

オートミール寒天  
(Difco 0552)

G : 非常に抑制的、1.5-2.5cm  
S : 円形、平坦、フェルト状～綿状、  
放射状に皺がよっている、  
いくらかの分生子構造を産生した、  
中央部にて鈍い緑色(30D4-30E4)であり、  
縁部でオレンジ白色(6A2)であり、  
そして灰色がかった褐色の可溶性色素  
を産生する

略号

G : 生育、コロニーのサイズを直径で測定した

S : コロニー表面、R : 裏面

\*麦芽抽出物寒天、ツアベック溶液寒天、および MY20 寒天の組成物は、JCM Catalogue of Strains (Nakase, T., 第6版, 第617頁, Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, 1995)に基づいた。

#### 【0052】

これらの特性を、25℃におけるインキュベーションの28日後に観察した。  
色の記載は、メチューン・ハンドブック・オブ・カラー (Kornerup, A. および J.  
H. Wanscher, 第3版, 第252頁, Methuen, London, 1978) に基づく。

#### 【0053】

WF27082の産生は、本明細書中に記載された特定の生物（これは、例示の目的のみのために与えられた）の使用に限定されないことが理解されるべきである。本発明はまた、天然の変異体および記載された生物から従来の手段（例えば、組換えDNA技術、X線照射、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、2-アミノプリンなどを用いる処理）により製造され得る人工の変異体を含む、WF27082を産生することができる任意の変異体の使用もまた包含する。

#### 【0054】

(WF27082の産生)

上記式(1)の化合物のうち、WF27082は、アクレモニウムに属するWF27082産生株を、好気性条件下（例えば、振盪培養、液内培養など）にて、同化可能な炭素源および窒素源を含む栄養培地中で生育させて製造される。

#### 【0055】

栄養培地中での好ましい炭素源は、炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、デンプン、フルクトースまたはグリセリンなど）である。

#### 【0056】

好ましい窒素源は、ビーナッツ粉末、酵母抽出物、ビーフ抽出物、ペプトン、ポリペプトン、グルテンミール、綿実粉、大豆粉、大豆ミール、コーンステーパー、乾燥酵母、コムギ芽（wheat germ）など、ならびに無機および有機の窒素化合物（例えば、アンモニウム塩（例えば、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなど）、尿素またはアミノ酸など）である。

#### 【0057】

炭素源および窒素源は、組み合わせて用いられることが有利であるが、微量の成長因子および相当量の無機栄養素を含むより純度の低い原料もまた使用に適切であるので、それらの純粋な形態で用いる必要はない。

#### 【0058】

所望の場合、無機塩（炭酸ナトリウムまたは炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウム、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、マグネシウム塩、銅塩、亜鉛塩、鉄塩またはコバルト塩など）が培地に添加され得る。

#### 【0059】

必要であれば、特に、培養培地が著しく発泡する場合、消泡剤（例えば、流動パラフィン、脂肪油（fatty oil）、植物油、鉱物油、シリコーンなど）が添加され得る。

#### 【0060】

培養混合物の攪拌および通気は、種々の方法（例えば、プロペラまたは同様の機械的攪拌装置による攪拌によって、醗酵槽を回転または振とうすることによってなど）により、達成され得る。

#### 【0061】

醗酵は、通常、約10℃と40℃との間、好ましくは約20℃～30℃の温度で、約50時間～150時間かけて（これは、醗酵条件およびスケールにより変

動し得る) 行う。

【0062】

次いで、得られた培養ブrossを、WF27082の回収のために、生物学的活性物質の回収および精製のために従来用いられてきた種々の手順（例えば、適切な溶媒またはいくつかの溶媒での溶媒抽出、適切な溶媒またはそれらの混合物からのクロマトグラフィーまたは再結晶）に供する。

【0063】

式(1)の化合物のうち、 $R^1$ がメチルであり、 $R^2$ がメチルであり、 $R^3$ が水素であり、そして $R^4$ がヒドロキシまたは保護されたヒドロキシ（例えば、FR235220）である化合物は、例えば、JP-A-7-196686号に記載の方法に従って調製することができる。これはまた、WF27082を上記のように調製しそして必要な部分を修飾することによっても得ることができる。この修飾は、それ自身公知の方法に従って実行され得る。

【0064】

WF27082は、溶媒和物の形態であり得、これは本発明の範囲内である。この溶媒和物は、好ましくは水和物およびエタノール和物を含む。

【0065】

上記式(1)の化合物の生物学的活性を示す例として、いくつかの生物学的データを以下に示す。

【0066】

(試験1. リンパ球の幼若化反応への効果)

WF27082BおよびFR235220を、試験化合物として用いた。

【0067】

リンパ球の幼若化試験を、マイクロタイタープレート（各ウェルが、0.1 ml RPMI-1640培地（10%のウシ胎児血清（FBS）、50 mMの2-メルカプトエタノール、ペニシリン（100単位/ml）およびストレプトマイシン（100  $\mu$ g/ml）を補充した）中にBalb/cマウス脾臓細胞を $1 \times 10^5$ 個含む）中で実行し、これに抗CD3抗体（2C11）（1  $\mu$ g/ml）を添加した。この細胞を37℃にて、5%湿CO<sub>2</sub> 雰囲気下にて、72時間にお

たってインキュベートした。培養後、リンパ球の幼若化反応における試験サンプルの抑制活性を、MTT[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド(MTT)]色素還元アッセイにより定量した。

【0068】

WF27082Bをメタノール中に溶解し、RPMI-1640培地中でさらに希釈し、終濃度が50 ng/mlまたはそれ以下となるよう培地に添加した。FR235220をメタノール中に溶解し、RPMI-1640培地中でさらに希釈し、終濃度が500 ng/mlまたはそれ以下となるよう培地に添加した。結果をそれぞれ表2および表3に示す。

【0069】

表2および3に示すように、WF27082BおよびFR235220は、抗CD3抗体により誘導されるマウスリンパ球幼若化反応を用量依存的に抑制した。WF27082Bは、特に強い効果を有することがわかった。

【0070】

【表2】

表2 抗CD3抗体により誘導されるマウスリンパ球幼若化反応におけるWF27082Bの効果

濃度 (ng/ml)	50	25	12.5	6.3	3.1	1.6	0.8
阻害 (%)	113.5	114.1	111.7	86.6	46.1	19.3	4.4

【0071】

【表3】

表3 抗CD3抗体により誘導されるマウスリンパ球幼若化反応におけるFR235220の効果

濃度 (ng/ml)	500	250	125	63	31	16	8	4
阻害 (%)	126.0	126.0	127.2	125.3	108.0	45.1	-1.3	-23.4

【0072】

(試験2. マウスDTH (遅延型過敏) 反応へのWF27082Bの効果)

雌Balb/cマウスを、皮下注射により、ヒツジ赤血球 ( $1 \times 10^8$ ) で免疫感作した。WF27082Bを、10%水性HCO-60に溶解させ、免疫感作1日前から8日間反復経口投与を行った。免疫感作して6日後、ヒツジ赤血球 ( $1.25 \times 10^8$ ) を右後ろの肉趾に注射し、24時間後、肉趾の腫脹をダイヤルゲージ (dial gauge) (Ozaki MFG Co., Ltd.)を用いて測定した。DTHの程度は、未処置の左肉趾と比較した、刺激した右肉趾の厚みで表した。

【0073】

表4に示すように、肉趾の腫脹は、WF27082Bの投与によりいかなる体重の損失もなく、用量依存的に顕著に抑制された。

【0074】

【表4】

表4. WF27082BのマウスDTH反応への効果

	N	用量(mg/kg)	肉趾の腫脹 (%阻害)	体重の増加 (g)
前処置せず (unprimed)	5		100***	1.2±0.2
下塗り (primed)	10		0	1.2±0.2
WF27082 B	5	10	20	1.5±0.2
	5	32	34**	1.5±0.3
	5	100	47***	1.1±0.3

\*\* : P<0.01

\*\*\* : P<0.001



#### 【0075】

(試験3. 部分的に精製したヒトヒストンデアセチラーゼの活性への効果)

ヒトヒストンデアセチラーゼの部分精製、 $[^3\text{H}]$  アセチル化ヒストンの調製およびヒストンデアセチラーゼ活性についてのアッセイは、基本的にYoshidaらにより提唱された方法に従って、以下のようにして実行した。

#### 【0076】

ヒトヒストンデアセチラーゼの部分精製—ヒトヒストンデアセチラーゼは、ヒトT細胞白血病Jurkat細胞から部分的に精製した。Jurkat細胞 ( $5 \times 10^8$ 細胞) を、40 ml のHDA緩衝液 (15 mMのリン酸カリウム (pH 7.5)、5%グリセロールおよび0.2 mM EDTAから構成される) 中に懸濁させた。ホモジナイズの後、核を遠心分離 ( $35,000 \times g$ 、10分間) により回収して、20 ml の1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を補充した同緩衝液中でホモジナイズした。粘性を有するホモジネートを超音波処理した後に遠心分離 ( $35,000 \times g$ 、10分間) により澄清化させて得た遠心上清に対して、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  濃度を3.5 Mまで上げることにより、デアセチラーゼを沈殿させた。沈殿したタンパク質を、10 ml のHDA緩衝液に溶解させ、同緩衝液4リットルに対して透析した。次いで、透析物を、同一の緩衝液で平衡化したDEAEセルロース (Whatman DE52) カラム ( $25 \times 85$  mm) 上に装填し、NaCl (300 ml) の直線勾配 (0~0.6 M) で溶出させた。ヒストンデアセチラーゼ活性の単一ピーク画分は、0.3 Mから0.4 Mの間のNaCl濃度で溶出された。

#### 【0077】

$[^3\text{H}]$  アセチル化ヒストンの調製—ヒストンデアセチラーゼアッセイのための基質としての $[^3\text{H}]$  アセチル標識化ヒストンを得るために、20 ml のRPMI-1640培地 (10% FBS、ペニシリン (50単位/ml) およびストレプトマイシン ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を補充した) 中のJurkat細胞 ( $1 \times 10^8$ 細胞) を、5  $\mu\text{M}$  の酪酸ナトリウムの存在下で、30分間にわたって、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ —95%空気雰囲気下で $75 \text{ cm}^2$  フラスコ中にて、300 MBq  $[^3\text{H}]$  酢酸ナトリウムとともにインキュベートし、遠心チューブ (50 ml) 中に移し、遠心分離 (1000 rpm、10分) により細胞を回収し、リン酸緩衝化生

理食塩水で1回洗浄した。洗浄した細胞を、15mlの氷冷したリシスバッファ  
ー(10mM Tris-HCl, 50mM 亜硫酸ナトリウム、1%Triton X  
-100, 10mM  $MgCl_2$ , 8.6%シュクロース, pH6.5)に懸濁させ  
た。Dounce homogenizerによるホモジネーション(30ストローク)の後、核を  
遠心分離(1000rpm、10分)により回収し、15mlのリシスバッファ  
ーで3回洗浄した後に15mlの氷冷洗浄緩衝液(10mM Tris-HCl  
、13mM EDTA、pH 7.4)で1回、連続的に洗浄した。ペレットを  
、ミキサーを用いて6mlの氷冷水中に懸濁させ、68mlの $H_2SO_4$ を添加し  
て、0.4Nの濃度にした。4℃での1時間にわたるインキュベーションの後、  
懸濁液を5分間、15,000rpmで遠心分離し、上清を回収して60mlの  
アセトンと混合した。-20℃にて一晩インキュベーションした後、凝集した物  
質をマイクロ遠心分離により回収し、風乾した後に-8℃にて貯蔵した。

【0078】

ヒストンデアセチラーゼ活性についてのアッセイ-標準アッセイとして、10  
μlの $[^3H]$ アセチル標識化ヒストンを、90μlの酵素画分に添加し、そし  
て混合物を25℃で30分間インキュベートした。反応を、10μlのHClを  
添加することにより停止させた。遊離した $[^3H]$ 酢酸を1mlの酢酸エチルで  
抽出した後に0.9mlの溶媒層を回収し、10mlのトルエンシンチレーショ  
ン溶液に加えて、放射活性の測定を行った。

【0079】

表5に示すように、WF27082B、EおよびFならびにFR235220  
は、部分精製ヒト(Jurkat細胞)ヒストンデアセチラーゼの活性を用量依存的に  
強力に阻害した。

【0080】

【表5】

表5 部分精製ヒトヒストンデアセチラーゼの活性への効果

濃度 (ng/ml)		1000	100	10	1
阻害 (%)	WF27082 B	98.6	76.5	37.3	1.9
	WF27082 E	104.9	88.5	57.6	11.1
	WF27082 F	91.7	74.1	36.5	11.4
	FR235220	94.6	74.6	33.7	-13.1

【0081】

(試験4. ヒト腫瘍細胞株に対するWF27082Bの抗腫瘍活性)

ヒト腫瘍細胞株に対するWF27082Bの細胞毒性活性を、インビトロにて以下のように測定した。細胞増殖を50%阻害するのに必要とされる化合物の濃度 ( $IC_{50}$ ; ng/ml) を、処理した細胞の増殖率 (対照に対するパーセンテージ) に対する濃度の対数をプロットすることにより測定した。ヒトT細胞白血病Jurkat細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/ml) およびヒト結腸腺癌腫 (adenocarcinoma) HT-29細胞 ( $5 \times 10^4$  細胞/ml) を、 $100 \mu$ l のRPMI-1640培地 (10%FBS、ペニシリン (50単位/ml) およびストレプトマイシン ( $50 \mu$ g/ml) を補充した) 中で、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ -95%空気雰囲気下でWF27082Bで処理した。細胞毒性を、上記MTT法に従って、550nmにて (およびリファレンスとして660nmにて) 比色定量により測定した。

【0082】

結果を表6に示す。WF27082Bは、Jurkat細胞およびHT-29細胞に対して、強力な抗腫瘍活性を有していた。

【0083】

【表6】

表6 ヒト腫瘍細胞株に対するWF27082Bの抗腫瘍活性（インビトロ）

IC50(ng/ml)	
Jurkat	HT-29
11	14

【0084】

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（例えば、式（I）の化合物）を含む本発明の医薬組成物は、異常な遺伝子発現により引き起こされる疾患（例えば、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病（APL）、原生動物感染など）のための治療薬および予防薬として有用である。さらに、本発明の医薬組成物は、抗腫瘍剤および免疫抑制剤（これは、以下に例示する臓器移植後の拒絶および自己免疫疾患を防止する）として有用である。

【0085】

臓器または組織（例えば、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚、角膜、肺、膵臓、小腸、肢、筋肉、神経、椎骨間円板、気管、筋芽細胞、軟骨など）の移植による拒絶反応；

骨髄移植後の移植片対宿主反応；

自己免疫疾患（例えば、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺腫、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病など）；

および病原性微生物（例えば、アスペルギルス・フミガーツス、フザリウム オキシスポルム、トリコフィトン アステロイデスなど）により引き起こされる感染。

【0086】

さらに、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（例えば、式（I）の化合物）の医薬製剤は、以下の疾患の処置および予防に有用である。

【0087】

炎症性または増殖亢進性皮膚炎または免疫仲介型皮膚疾患（例えば、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、湿疹様皮膚炎、脂漏性皮膚炎、扁平苔癬、天疱

瘡、水疱性天疱瘡、表皮水疱瘡、蕁麻疹、血管性浮腫、脈管炎 (vasculitides)、紅斑、皮膚好酸球増加症、エリテマトーデス、にきびおよび円形脱毛症) ;

眼の自己免疫疾患 (例えば、角結膜炎、春季カタル、ペーチェット病に付随するブドウ膜炎、角膜炎、ヘルペス性角膜炎、円錐形角膜炎 (conical keratitis)、角膜表皮ジストロフィー、角膜白斑、眼天疱瘡、モーレン潰瘍、強膜炎、グレイヴス眼障害、フォーグトー小柳ー原田症候群、乾燥角結膜炎 (ドライアイ)、フリクテン、虹彩毛様体炎、サルコイドーシス、内分泌眼障害など) ;

可逆的閉塞性気道疾患 [喘息 (例えば、気管支喘息、アレルギー性喘息、内因性喘息、外因性喘息および塵埃喘息)、特に慢性または難治性喘息 (例えば、遅発性喘息および気道反応性亢進)、気管支炎など] ;

粘膜または血管の炎症 (例えば、胃潰瘍、虚血性または血栓性の血管障害、虚血性腸疾患、腸炎、壊死性全腸炎、熱による火傷に関連する消化管の損傷、ロイコトルエン B 4 仲介型疾患) ;

消化管の炎症 / アレルギー (例えば、小児脂肪便症、直腸炎、好酸性胃腸炎、肥満細胞症、クローン病および潰瘍性大腸炎) ;

胃腸管から離れた症候性発現を伴う食物関連アレルギー性疾患 (例えば、偏頭痛、鼻炎および湿疹) ;

腎臓疾患 (例えば、間質性腎炎、グッドパスチャー症候群、溶血性尿毒症症候群および糖尿病性腎障害) ;

神経疾患 (例えば、多発性筋炎、ギランーバレー症候群、メニエール病、多発性神経炎、単発性神経炎、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化 (ALS) および神経根障害) ;

脳虚血性疾患 (例えば、頭部損傷、脳内における出血 (例えば、くも膜下出血、脳内出血)、脳血栓、脳塞栓症、心停止、卒中、一過性脳虚血発作 (TIA) および高血圧性脳障害) ;

内分泌疾患 (例えば、甲状腺機能亢進症およびバセドウ病) ;

血液疾患 (例えば、赤芽球ろう、再生不良性貧血、形成不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、顆粒球減少症、悪性貧血、巨大赤芽球貧血および赤血球形成不全) ;

骨疾患（例えば、骨粗鬆症）；  
 呼吸器疾患（例えば、サルコイドーシス、肺線維症および特発性間隙性肺炎）；  
 皮膚疾患（例えば、皮膚筋炎、尋常性白斑、尋常性魚鱗癬、光線過敏症および皮膚T細胞リンパ腫）；  
 循環器疾患（例えば、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、大動脈炎症候群、結節性多発性動脈炎および心筋症）；  
 膠原疾患（例えば、強皮症、ウェーゲナー肉芽腫およびシューグレン症候群）；  
 脂肪過多症；  
 好酸性筋膜炎；  
 歯周病（例えば、歯肉、歯周、歯槽骨またはセメント質への損傷）；  
 ネフローゼ症候群（例えば、糸球体腎炎）；  
 男性型脱毛症、老人性脱毛症；  
 筋ジストロフィー；  
 膿皮症およびセザリイ症候群；  
 染色体異常関連疾患（例えば、ダウン症候群）；  
 アジソン病；  
 活性酸素仲介疾患[例えば、臓器損傷（例えば、保存、移植または塞栓症、心筋梗塞などの虚血疾患に関連する、臓器（例えば、心臓、肝臓、腎臓、消化管など）の虚血性循環障害）；  
 腸疾患（例えば、エンドトキシンショック、偽膜性大腸炎および薬物または放射線により誘発される大腸炎）；  
 腎臓疾患（例えば、虚血性急性腎機能不全、慢性腎不全）；  
 肺疾患（例えば、肺中酸素または薬物（例えば、パラコート、ブレオマイシンなど）により引き起こされる中毒、肺癌および肺気腫）；  
 眼の疾患（例えば、白内障、鉄沈着疾患（眼球鉄錆症）、網膜炎、色素沈着（pigmentosa）、老人性斑点変質、硝子体癒痕、角膜のアルカリ火傷）；  
 皮膚炎（例えば、多形性紅斑、線状免疫グロブリンA性皮膚炎、セメント皮膚炎（cement dermatitis）；  
 ならびに他の疾患（例えば、歯肉炎、歯周炎、敗血症、脾臓炎および環境汚染（

例えば、大気汚染)、加齢、発癌物質、癌転移および高山病により引き起こされる疾患) ] ;

ヒスタミン遊離またはロイコトリエンC<sub>4</sub>遊離により引き起こされる疾患 ;

脈管形成後の冠状動脈再狭窄および外科手術後の癒着の防止 ;

自己免疫疾患および炎症性症状 (例えば、原発性粘膜水腫、自己免疫萎縮性胃炎、早発性閉経、男性不妊、若年性糖尿病、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感神経性眼炎、水晶体原性ブドウ膜炎、特発性白血球減少症、活性慢性肝炎、特発性肝硬変、円板状エリテマトーデス、自己免疫精巣炎、関節炎 (例えば、変形性関節症) または多発性軟骨炎 ;

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染、AIDS ;

アレルギー性結膜炎 ;

外傷、火傷または外科手術による、肥大型瘢痕およびケロイド。

#### 【0088】

従って、本発明の医薬組成物は、肝臓疾患 [例えば、免疫原性疾患 (例えば、慢性自己免疫肝臓疾患 (例えば、自己免疫肝臓病、原発性胆管性肝硬変、または硬化性胆管炎)、部分的肝臓切除、急性肝臓壊死 (例えば、毒素、ウイルス性肝炎、ショックまたは酸素欠乏症による壊死)、B型肝炎、非A型非B型肝炎、肝硬変および肝不全 (例えば、劇症肝炎、遅発型肝炎および慢性から急性に移行した肝不全 (慢性肝臓病における急性肝不全) ) ) の処置および予防のために有用である。

#### 【0089】

本発明の医薬組成物は、式 (I) の化合物のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤を、活性成分として、外用、内用、または経口で投与するために適切な有機または無機の担体または賦形剤との混合物中に含む、医薬製剤の形態 (例えば、固体、半固体または液体の形態) で使用され得る。この活性成分は、例えば、通常非毒性の医薬上許容され得る担体 (錠剤、ペレット、カプセル、座剤、溶液、乳濁液、懸濁液、注射液、軟膏、塗布薬、点眼液、ローション、ゲル、クリームおよび使用に適切な任意の他の形態用) とともに配合され得る。

#### 【0090】

使用され得る担体は、水、グルコース、ラクトース、アカシアガム、ゼラチン、マンニトール、デンプンペースト、マグネシウムトリシリケート、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイド状シリカ、ポテトデンプン、尿素、および製剤を固体、半固体または液体の形態で製造するのに使用するために適切な他の担体であり、そしてさらに、補助剤、安定剤、増粘剤、可溶化剤、着色剤および香料が使用され得る。

#### 【0091】

この組成物をヒトに適用するためには、静脈内投与、筋肉内投与、局所投与または経口投与により適用することが好ましい。式(1)の化合物のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤の治療的有効量の用量は、処置されるべき各個別の患者の年齢および症状により変動しかつこれらに依存するが、個別の患者が処置されるべきである場合、静脈内投与では、ヒトの体重1kg当たり、式(1)の化合物のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤0.01~10mgの1日用量、筋肉内投与の場合、ヒトの体重1kg当たり、式(1)の化合物のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤0.1~10mgの1日用量、経口投与の場合、ヒトの体重1kg当たり、式(1)の化合物のようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤0.5~50mgの1日用量が、一般に処置のために与えられる。

#### 【0092】

以下の実施例は、本発明をより詳細に例示する目的のために与えられる。

#### 【0093】

##### 【実施例】

##### (実施例1)

##### (1) WF27082Bの醗酵生産:

液体シード培地(30ml) (4.0%シュクロース、1.0%グルコース、2.0%可溶性デンプン、3.0%綿実粉、1.5%大豆粉、1.0%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2%CaCO<sub>3</sub>、0.05%Adekano1 LG-109(消泡剤、Asahi Denka Co., Ltd.)および0.05%Silicone KM-70(消泡剤、Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.)を含む)を100ml容三角フラスコに注ぎ、120℃で30分間滅菌した。一白金耳の真菌株No. 27082を斜面培養物



からフラスコ中に植え付け、25℃にて、220rpm (5.1cm振幅) にてロータリーシェーカー上で4日間培養した。シード培養物(6ml)を、30リットル容のジャー醗酵槽中の20リットルの滅菌生産培地(3.0%の修飾デンプン、2.0%の綿実粉、0.2%のコムギ芽、0.1%の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%の $\text{NaCl}$ 、0.0005%の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%のAdekanol LG-109および0.05%のSilicone KM-70 (pH 7.0) から構成される) に植え付けた。20リットル/分の通気および200~300rpmでの攪拌下にて、醗酵を25℃で4日間実行した。

#### 【0094】

(分析HPLC条件)

カラム YMC Pack ODS-AM AM303, S-5 120A  
(長さ250mm×内径4.6mm、YMC Co., Ltd.)  
溶離液 50%アセトニトリル水溶液  
流速 1 ml/分  
検出 UV (210nmにて)  
保持時間 WF 27082B 10.4分

#### 【0095】

(2) WF 27082Bの単離:

培養したブロス(20L:380mgのWF 27082Bを含む)を、20Lのアセトンを用いて断続的に混合することにより抽出した。アセトン抽出物をケイソウ土を用いて濾過し、等容量の水で希釈した。希釈した濾液を、Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co., Ltd.) のカラム(1L)に通過させた。このカラムを、水および70%メタノール水溶液で洗浄後、メタノールで溶出させた。溶出液(1L)を2Lの水で希釈し、45%アセトニトリル水溶液を充填したYMC GEL ODS-AM 120-S50 (YMC Co., Ltd.) のカラム(180ml)上にアプライした。このカラムを4.5%のアセトニトリル水溶液で溶出し、溶出を上記に示す分析HPLCによりモニターした。WF 27082Bに対応する部分を真空中で濃縮して、水性の残渣を得た。この残渣を酢酸エチルで抽出し、抽出物を真空中で濃縮して、油性の残渣(351mgのWF 2

7082Bを含む)を得た。この油性残渣を少量のメタノールに溶解させ、20mlのシリカゲル60(70~230メッシュ、MERCK)と混合し、濃縮して乾燥させた。乾燥粉末を、クロロホルムを充填した同一のシリカゲル60(230ml)を用いるカラムクロマトグラフィーに供した。このカラムをクロロホルムで溶出させ、溶出を上記に示す分析HPLCによりモニターした。精製WF27082Bに対応する画分を真空中で濃縮して、230mgの無色のオイルを得た。

#### 【0096】

##### (実施例2)

##### (1) WF27082EおよびFの醗酵生産：

培養したプロス(20L)を、実施例1の(1)と実質的に同じ方法で得た。

##### (2) WF27082EおよびFの単離：

培養プロス(20L)を、20Lのアセトンを用いて断続的に混合することにより抽出した。アセトン抽出物をケイソウ土を用いて濾過し、等容量の水で希釈した。希釈した濾液をDiaion HP-20(Mitsubishi Chemical Co., Ltd.)のカラム(1L)に通過させた。このカラムを、水および70%メタノール水溶液で洗浄後メタノールで溶出させた。溶出液(1L)を2Lの水で希釈し、45%アセトニトリル水溶液を充填したYMC GEL ODS-AM 120-S50(YMC Co., Ltd.)のカラム(180mL)上にアブライした。このカラムを45%アセトニトリル水溶液で溶出し、溶出を以下に示す分析HPLCでモニターした。WF27082EおよびFの混合物に対応する部分(500mL)を500mLの水で希釈し、60%メタノール水溶液を充填したYMC GEL ODS-AM 120-S50(YMC Co., Ltd.)のカラム(180mL)にアブライした。このカラムを60%メタノール水溶液で溶出し、WF27082EおよびFの混合物に対応する画分を真空中で濃縮して、水性の残渣を得た。この残渣を酢酸エチルで抽出し、抽出物を真空中で濃縮して、油性の残渣を得た。この油性残渣を少量のメタノールに溶解させ、分取HPLCに供し、バックトカラムFluofix 120E 1EW225(20mm×250mm, NEOS Co., Ltd.)に、40%メタノール水溶液を移動相として、流速9.9ml/分でアブライした。

。精製WF27082EおよびFに対応する画分（保持時間：WF27082E；74.8分、WF27082F；85.7分）を真空中で濃縮して、それぞれを油状残渣の形態で8mgおよび18mg得た。

【0097】

（分析HPLC条件）

カラム	YMC Pack ODS-AM AM303, S-5 120A （長さ250mm ×内径4.6mm, YMC Co., Ltd.）
溶離液	40%アセトニトリル水溶液
温度	50° C
流速	1 ml/分
検出	UV (210nmにて)
保持時間	WF27082 E 15.3分 WF27082 F 16.1分

【0098】

本願は、オーストラリアにおいて出願された出願第6469/1998号および9257/1999号を基礎としており、それらの内容は、引用することによって本明細書中に包含されるものである。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP 99/05597

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K5/12 C12P21/04 C12R1/645 A61K38/12 A61P33/02 A61P35/00 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT.</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 11366 A (MERCK & CO INC ;DULSKI PAULA M (US); GURNETT ANNE M (US); MYERS RO) 27 March 1997 (1997-03-27) The whole document; see especially page 6 and claim 14	1-20
A	GB 2 309 696 A (MERCK & CO INC) 6 August 1997 (1997-08-06) The whole document; see especially page 9 --- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are filed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 February 2000		16. 05 2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentstein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer GROENENDIJK, M

Form PCT/ISA/210 (separate sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter-  
national Application No  
PCT/JP 99/05597

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199540 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 1995-304271 XP002129775 &amp; JP 07 196686 A (TAKEDA CHEM IND LTD), 1 August 1995 (1995-08-01) cited in the application abstract</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 97 35990 A (JANISON TIMOTHY F ;HARVARD COLLEGE (US); TAUNTON JACK (US); HASSIG) 2 October 1997 (1997-10-02) the whole document</p> <p>-----</p>	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP 99/05597

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 12,15,17,19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 4,9,10(partially)  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-3,5-8,17,18 (complete); 4,9-16,19,20 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 4,9,10(partially)

Present claims 4,9 and 10 relate to a compound or its preparation defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a histone deacetylase inhibitory activity. The process of claim 9 is only described in terms of the compounds to be obtained and does not itself define said compounds.

These claims cover all compounds (and processes for their preparation) having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds (see claim 1). In the present case, said claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds and also the process for their preparation by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds defined in claim 1, their preparation and use.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/88A/ 210

1. Claims: 1-3,5-8,17,18(all complete),4,9-16,19,  
20(all partially)

Compounds as defined in claim 1, their preparation, their  
compositions and use and a strain as defined in claim 3.

2. Claims: 11-16,19,20(all partially)

Compositions as defined in claims 11 and 14 as far as  
relating to a compound according to the formula of claim 11  
wherein R3 is hydrogen and R2 is methyl and their use

3. Claims: 19,20(all partially)

Use as defined in the claims 19 and 20 as far as not  
encompassed by the subjects 1 and 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Priority and Application No

PCT/JP 99/05597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711366 A	27-03-1997	AU 712801 B	18-11-1999
		AU 6979096 A	09-04-1997
		CA 2231251 A	27-03-1997
		EP 0855024 A	29-07-1998
		JP 11514857 T	21-12-1999
		US 5922837 A	13-07-1999
GB 2309696 A	06-08-1997	US 5922837 A	13-07-1999
JP 7196686 A	01-08-1995	NONE	
WO 9735990 A	02-10-1997	AU 2990597 A	17-10-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 33/00		A 6 1 P 35/00	
35/00		35/02	
35/02		37/06	
37/06		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 1 2 N 1/14	A
C 1 2 N 1/14		9/99	
9/99		C 1 2 P 21/02	
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/64	
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW ), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, L C, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, T J, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考) 4B064 AG37 CA05 DA01			
4B065 AA57 CA24 CA44			
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA16			
BA24 CA05 DC32 NA14 ZA75			
ZB08 ZB11 ZB26 ZB27 ZB38			
ZC20			
4H045 AA10 AA20 AA30 BA13 BA30			
CA15 DA55 EA22 EA24 EA27			
EA28 FA72			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**